

DESARROLLO DE NUEVOS BIOCONSERVANTES APLICABLES A PRODUCTOS LÁCTEOS

Autores: Pilar García, Beatriz Martínez y Ana Rodríguez

Instituto de Productos Lácteos de Asturias (IPLA-CSIC). Apdo. 85. 33300-Villaviciosa, Asturias.

e-mail:pgarcia@ipla.csic.es

Teléfono: +34 985 89 21 31

Fax: +34 985 89 22 33

Resumen

Actualmente los consumidores muestran una especial preferencia por alimentos de fácil preparación, de calidad, seguros, y naturales, que estén poco procesados pero a la vez tengan una mayor vida útil. Esto implica que las tecnologías de conservación de alimentos deben afrontar nuevos retos, para lo cual se han de explorar metodologías alternativas. Entre los sistemas de conservación, la bioconservación está teniendo un importante desarrollo, ya que utiliza componentes naturales que se añaden al alimento para garantizar su seguridad. Un ejemplo de innovación en bioconservación lo constituye la utilización de bacteriófagos (virus que matan bacterias) como agentes antimicrobianos para impedir el desarrollo de bacterias patógenas en los alimentos. En este contexto, se presenta un resumen de las posibilidades que tienen los bacteriófagos en la conservación de los productos lácteos, y en concreto, se muestra la eficacia de los mismos para eliminar *Staphylococcus aureus* durante la elaboración de cuajadas.

La bioconservación

En los últimos años existe un interés creciente por el diseño de alimentos saludables, con objeto de responder a la demanda de un gran número de consumidores que desean ingerir alimentos “naturales”, es decir, que se han elaborado en condiciones que garanticen una calidad sanitaria óptima con el mínimo procesamiento. El sistema de conservación de alimentos denominado *bioconservación* satisface estos requisitos ya que explota la capacidad de microorganismos reconocidos como seguros (GRAS) y/o de sus metabolitos para inhibir el desarrollo en alimentos de microorganismos alterantes y patógenos. Este sistema de conservación, si bien constituye una de las formas de conservación más antiguas, cobra relevancia al proporcionar alternativas válidas y de hecho preferibles respecto al uso de aditivos artificiales.

Entre la amplia variedad de alimentos, la leche, por su riqueza en nutrientes y su pH neutro, constituye un medio favorable para la multiplicación de los microorganismos. Aunque el grado de contaminación inicial de la leche suele ser bajo, la manipulación posterior puede contaminarla con microorganismos patógenos, que en determinadas condiciones pueden desarrollarse, y cuando son ingeridos con el alimento pueden ocasionar toxiinfecciones alimentarias (TIA). El proceso de fermentación de la leche que tiene lugar durante la elaboración de una amplia variedad de productos lácteos constituye un buen ejemplo de bioconservación. Durante la fermentación, los cultivos iniciadores (fermentos o starters), constituidos fundamentalmente por bacterias lácticas, contribuyen al desarrollo de las características organolépticas del producto final y al mismo tiempo, crean un ambiente desfavorable para el crecimiento de microorganismos alterantes y patógenos al producir ácidos orgánicos, con la consecuente bajada del pH, y, en algún caso, otros metabolitos inhibitorios (bacteriocinas).

Una alternativa a esta forma tradicional de bioconservación sobre la que deseamos llamar la atención, es *la utilización de bacteriófagos como antimicrobianos*.

Los bacteriófagos como agentes antimicrobianos

Los bacteriófagos son virus que infectan bacterias. Para poder multiplicarse necesitan una bacteria huésped, en el interior de la cual se replican, y finalmente inducen la lisis de la misma para que tenga lugar la liberación de la progenie viral (Fig. 1). Por tanto, los bacteriófagos pueden considerarse como agentes antimicrobianos que, aparte de su potencial valor terapéutico (Kutter & Sulakvelidze, 2005), han demostrado su eficacia en la eliminación de contaminaciones bacterianas en los alimentos (Hudson *et al.*, 2005).

Controlar el desarrollo de bacterias indeseables en alimentos mediante el uso de bacteriófagos presenta una serie de ventajas muy convenientes respecto a otras estrategias. Los bacteriófagos son componentes naturales no ajenos a los alimentos, es decir, se encuentran habitualmente en los mismos. Además, se multiplican en presencia de un número suficiente de bacterias huésped, lo que aumenta su eficacia. Un aspecto importante es su especificidad. Pueden utilizarse para la eliminación de las bacterias patógenas sin afectar a los demás constituyentes de la microbiota bacteriana deseable en el alimento, como son las bacterias que componen los cultivos iniciadores. Pero quizá lo más relevante es que son inocuos para el consumidor y no afectan a las características organolépticas del producto final.

El diseño de nuevos bioconservantes basados en bacteriófagos está aún poco desarrollado en el caso de los productos lácteos. Únicamente se han publicado tres trabajos hasta el momento, en los que se describe la utilización de bacteriófagos para

impedir el desarrollo de patógenos en este grupo de alimentos. En uno de ellos se describe la utilización de bacteriófagos específicos frente a *Salmonella* Enteritidis en la elaboración del queso Cheddar. En este caso, se realizaron fabricaciones de queso con leche cruda y pasteurizada, contaminada previamente con 10^4 ufc/ml de la bacteria. A uno de los lotes se añadió además 10^8 ufp/ml del bacteriófago SJ2. La presencia del bacteriófago redujo los recuentos del patógeno incluso por debajo del nivel de detección (50 ufc/ml) en los quesos elaborados con leche pasteurizada a los 3 meses de maduración (Modi *et al.*, 2001).

Por otro lado, cabe señalar que el bacteriófago P100 que infecta a *Listeria monocytogenes* es capaz de eliminar este patógeno en quesos frescos (Carlton *et al.*, 2005). Su eficacia es tal, que ya se comercializa una mezcla de bacteriófagos, denominada Listex P100, que ha sido aprobada recientemente por la FDA (Food & Drug Administration) como GRAS para su utilización como conservante en todo tipo de alimentos incluyendo quesos (Federal Register: August 18, 2006 (Volume 71, Number 160) Page 47729-47732).

Importancia de *Staphylococcus aureus* como contaminante en productos lácteos

Staphylococcus aureus es una bacteria patógena de gran importancia en Seguridad Alimentaria. Su capacidad para producir enterotoxinas resistentes a la temperatura y, por tanto, invulnerables a los procesos de pasteurización de la leche, la hacen responsable del 13,9% y 11,1% de los brotes asociados al consumo de queso y leche, respectivamente (Anonymous, 2003). Por ejemplo, se ha observado que la elaboración de queso con leche cruda, sobre todo en aquellos casos de baja o insuficiente acidificación de la cuajada, ha dado lugar a la aparición de brotes

toxiinfecciosos asociados al consumo de este tipo de productos. De hecho, una contaminación inicial en la leche de 10^3 ufc/ml de *S. aureus* puede ser suficiente para que se produzca enterotoxina A en niveles detectables en el queso.

Uno de los focos de contaminación de la leche cruda se encuentra en las ubres de vacas con mastitis ya que *S. aureus* es uno de los principales agentes causantes de esta enfermedad. Además, no hay que olvidar que uno de los hábitats de esta bacteria es la piel y las fosas nasales, desde donde también puede contaminar los productos lácteos durante su elaboración. Por otra parte, la capacidad de *S. aureus* para formar biopelículas o biofilms en la superficie de los tanques es la principal causa de contaminación del producto durante su procesamiento a nivel industrial.

Biocontrol de *S. aureus* en productos lácteos con bacteriófagos

Pese a las mejoras tecnológicas introducidas en los procesos de fabricación, los productos lácteos siguen siendo causa de brotes de TIA producidas por *S. aureus*. Teniendo en cuenta que los tratamientos térmicos aplicados en la actualidad son seguros y eficaces, los casos de TIA asociados al consumo de productos lácteos elaborados a partir de leche pasteurizada son causados por la presencia de agentes patógenos procedentes de contaminaciones cruzadas posteriores al tratamiento térmico. No obstante, en las TIA causadas por *S. aureus*, la bacteria puede haber producido su enterotoxina termoestable con anterioridad, como lo demuestra el hecho de que en muchos de los brotes descritos se detectó la enterotoxina en la muestra pero no se aisló el microorganismo. Para evitar estos casos es fundamental el control de la temperatura de conservación de la leche y, además, el desarrollo de otros sistemas que impidan la proliferación del patógeno con anterioridad y posterioridad al tratamiento térmico.

Uno de los sistemas que planteamos para el control del desarrollo de *S. aureus* es la utilización de bacteriófagos específicos. Éstos podrían utilizarse como bioconservantes aplicables tanto a la leche cruda, para evitar el desarrollo de la bacteria patógena durante el almacenamiento, como a la leche pasteurizada, para impedir que contaminaciones accidentales durante el proceso de elaboración del queso provocasen un brote. Para diseñar una mezcla de bacteriófagos, que pueda ser utilizada como bioconservante frente a *S. aureus*, es preciso definir en primer lugar el grupo de cepas sobre las que se pretende que los bacteriófagos sean eficaces. En el caso de *S. aureus*, las cepas que con mayor frecuencia contaminan la leche son aquéllas que ocasionan mastitis en las vacas. En nuestro laboratorio hemos obtenido, a partir de muestras de leche y queso, bacteriófagos específicos frente a las cepas de *S. aureus* que con mayor frecuencia causan mastitis en vacas en el Principado de Asturias. De todos los bacteriófagos aislados, se seleccionaron dos, Φ H5 y Φ A72, capaces de infectar todas las cepas de *S. aureus* de nuestra colección (22) (Fig. 2), lo que los convierte en potenciales bioconservantes de productos lácteos. Con objeto de mejorar su capacidad antimicrobiana, se seleccionaron variantes líticas (Φ 35 y Φ 88) de ambos bacteriófagos. Estas variantes son bacteriófagos incapaces de lisogenizar, es decir, incapaces de establecerse en el genoma bacteriano y de conferir inmunidad al patógeno, lo que los hace más eficaces en el proceso de infección y de eliminación de la bacteria huésped.

Los bacteriófagos líticos (Φ 35 y Φ 88) han sido ensayados con éxito como bioconservantes en cuajadas (García *et al.*, 2007). Para constatar su efecto inhibitor del desarrollo de *S. aureus*, se elaboraron cuajadas ácidas y enzimáticas, utilizando leche contaminada con 10^6 ufc/ml del patógeno, en presencia y en ausencia de los bacteriófagos Φ 35 y Φ 88 (10^8 ufp/ml). En el caso de elaboración de cuajadas ácidas se utilizó como cultivo iniciador la cepa *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* IPLA 947 (10^7

ufc/ml) y la coagulación de la leche se realizó a 25°C durante 24 h. Las cuajadas enzimáticas se obtuvieron mediante la coagulación de la leche, previamente contaminada con *S. aureus*, con cuajo de origen animal e incubando a 30°C durante 45 min. A lo largo del proceso se realizaron recuentos de bacterias viables.

Como se observa en la Fig. 3, durante la elaboración de la cuajada ácida y en ausencia de bacteriófagos, la bacteria patógena *S. aureus* se multiplicó en la leche alcanzando más de 10^8 ufc/ml, un nivel de contaminación muy peligroso si tenemos en cuenta que contaminaciones superiores a 10^5 ufc/ml ocasionan intoxicación alimentaria. Sin embargo, cuando el cultivo iniciador *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* IPLA 947 estaba presente, se observó una inhibición parcial en el crecimiento de *S. aureus* durante las primeras 8 h de incubación, lo que se refleja en una diferencia de 1,6 unidades logarítmicas en el recuento de viables en presencia y ausencia de cultivo iniciador. Esto se debe a que la producción de ácido láctico, que tiene lugar durante la fermentación de la leche, provoca un retraso en el crecimiento del patógeno que es sensible a las condiciones ácidas. Cuando la elaboración de cuajada se realizó en presencia de la mezcla de bacteriófagos ($\Phi 35$ y $\Phi 88$), el número de bacterias patógenas viables se redujo drásticamente, de tal modo que no se detectaron después de 4 h de incubación.

De manera similar se observó que los bacteriófagos $\Phi 35$ y $\Phi 88$ tenían un efecto bactericida frente a *S. aureus* cuando se elaboraron cuajadas enzimáticas (Fig. 4). En este caso se observó un incremento en el recuento del patógeno durante el proceso de coagulación de la leche, alcanzándose valores superiores a 10^8 ufc/ml. Por el contrario, en presencia de bacteriófagos, se produjo una rápida disminución en el número de bacterias patógenas viables, de tal modo que *S. aureus* ya no se detecta (< 10 ufc/ml) en la cuajada tras 1 h de incubación.

Conclusiones

En el desarrollo de nuevos sistemas de conservación de productos lácteos se ha evaluado la eficacia de los bacteriófagos como bioconservantes. La aplicación a la leche pasteurizada de una mezcla de dos bacteriófagos específicos frente a *S. aureus* permitió la eliminación del patógeno durante el proceso de elaboración de cuajadas. Por tanto, los bioconservantes basados en bacteriófagos constituyen una estrategia válida para disminuir el riesgo de contaminación bacteriana durante la elaboración de cuajadas y garantizar su salubridad. A la vista de la eficacia de los bacteriófagos es coherente plantearse su uso en otras áreas de actuación como la mejora de la higiene personal y como desinfectantes de las superficies y utensilios en la industria láctea.

Bibliografía

Anonymous. 2003. European Commission, Health & Consumer Protection. Directorate-General, 26–27 March. Opinion of the scientific committee on veterinary measures relating to public health on staphylococcal enterotoxins in milk products, particularly cheeses.

Carlton, R. M., Noordman, W. H., Biswas, B., de Meester, E. D., and Loessner, M. J. 2005. Bacteriophage P100 for control of *Listeria monocytogenes* in foods: Genome sequence, bioinformatic analyses, oral toxicity study, and application. *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, 43, 301-312.

García, P., Madera, C., Martínez, B., and Rodríguez, A. 2007. Biocontrol of *Staphylococcus aureus* in curd manufacturing processes using bacteriophages. *Int. Dairy J.* 17, 1232-1239.

Hudson J. A., Billington, C., Carey-Smith, C., and Greening, G. 2005. Bacteriophages as biocontrol agents in food. *J. Food Prot.* 68, 426-437.

Kutter, E., and Sulakvelidze, A. 2005. Bacteriophages Biology and Applications. Boca Raton, FL, USA. CRC Press.

Modi, R., Hirvi Y., Hill A., and Griffiths, M. W. 2001. Effect of phage on survival of *Salmonella* Enteritidis during manufacture and storage of Cheddar cheese made from raw and pasteurized milk. *J. Food Prot.* 64, 927-933.

Figuras

Figura 1.- Ciclo de vida de un bacteriófago cuando infecta una bacteria. 1) Un bacteriófago se encuentra con una bacteria sensible. 2) El bacteriófago se une a la superficie de la bacteria. 3) El bacteriófago introduce su material genético en el interior de la bacteria sensible. 4) El material genético se replica en el interior de la bacteria generándose multitud de copias. 5) Se sintetizan envueltas proteicas en el interior de las cuales se introduce el material genético del bacteriófago para formar partículas fágicas maduras. 6) Los nuevos bacteriófagos destruyen la envuelta de la bacteria y se liberan al exterior celular para comenzar de nuevo el ciclo.

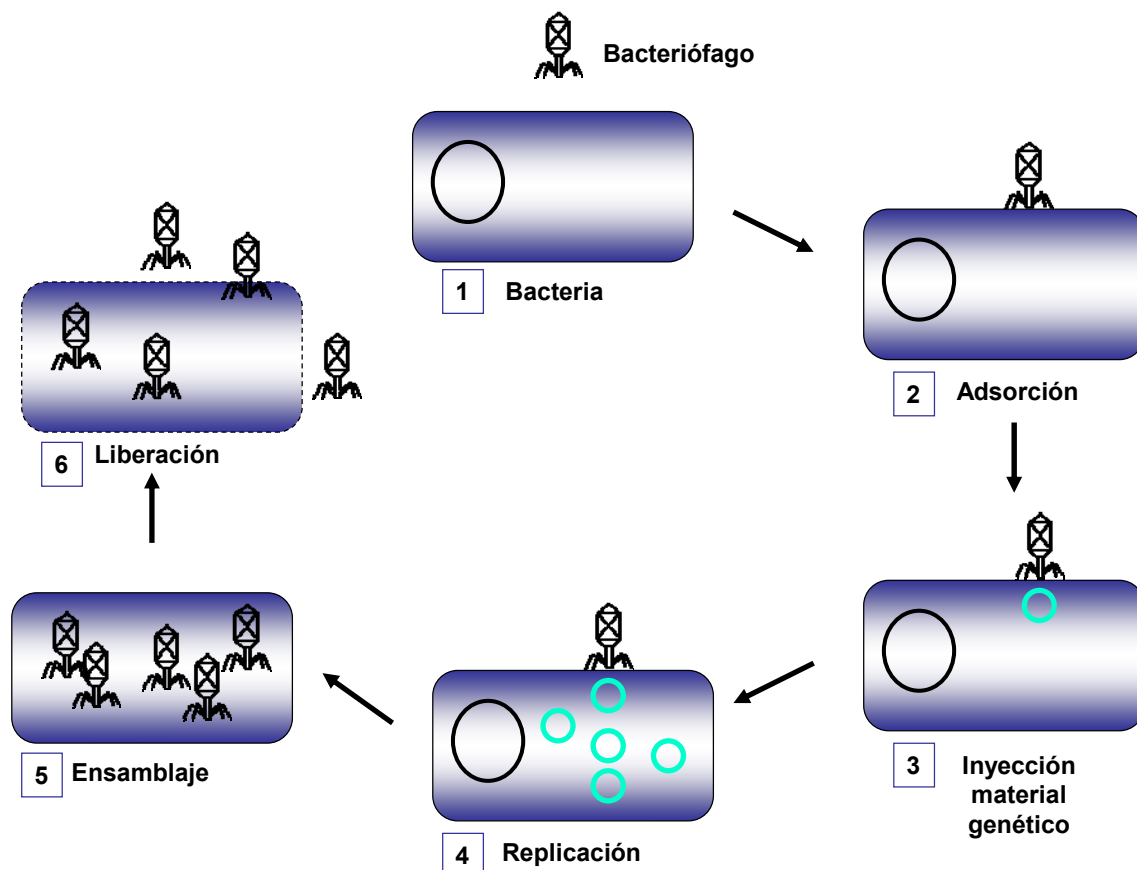


Figura 2.- Imagen al microscopio electrónico de los bacteriófagos Φ H5 y Φ A72.



Φ H5



Φ A72

Figura 3. Recuento de viables de *S. aureus* (ufc/ml) y número de bacteriófagos (ufp/ml) durante la elaboración de cuajada ácida. * pH, ♦ *S. aureus*, ■ *S. aureus* + *L. lactis* subsp. *lactis* IPLA 947, □ *S. aureus* + *L. lactis* subsp. *lactis* IPLA 947 + Φ35 + Φ88, Δ bacteriófagos Φ35 + Φ88. (Figura adaptada de García *et al.*, 2007)

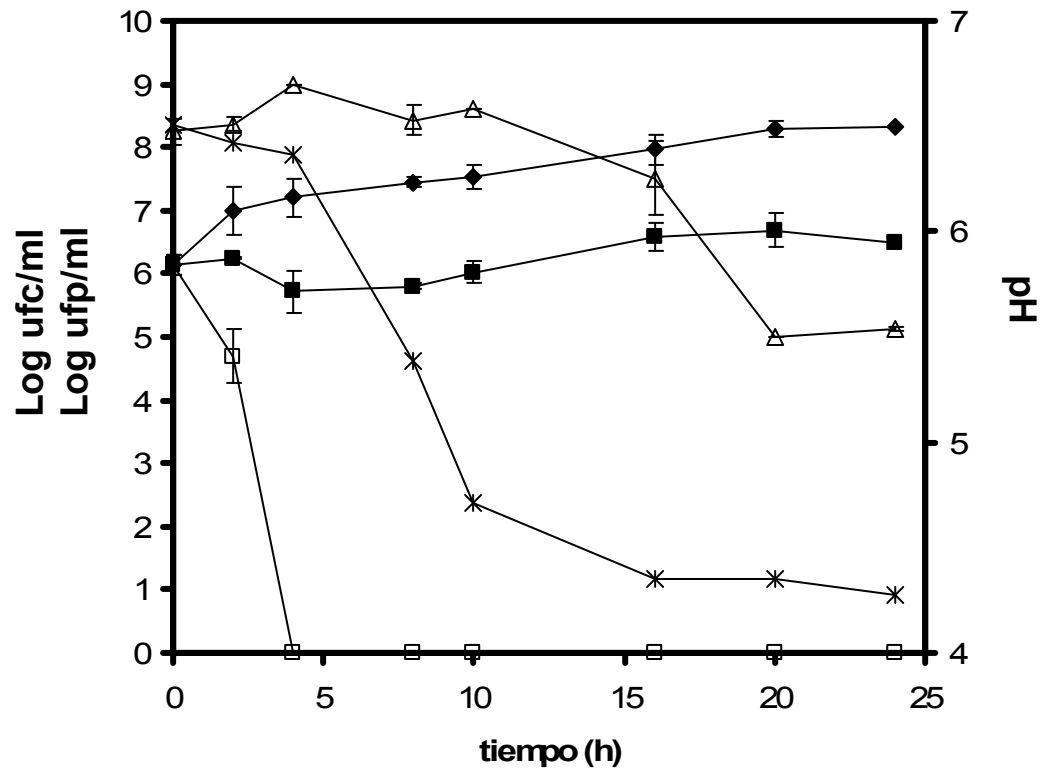


Figura 4. Recuento de viables de *S. aureus* (ufc/ml) y número de bacteriófagos (ufp/ml) durante la elaboración de cuajada enzimática. Δ bacteriófagos $\Phi 35 + \Phi 88$, \blacksquare *S. aureus* en cuajada y \square *S. aureus* + bacteriófagos $\Phi 35 + \Phi 88$ en cuajada, \blacklozenge *S. aureus* en suero y \times *S. aureus* + bacteriófagos $\Phi 35 + \Phi 88$ en suero. (Figura adaptada de García *et al.*, 2007).

